نقش گیرنده‌های موسکارینی بر انقباضات ایلئوم جدا شده موش صحرایی نر بالغ

رائده تولائی*[1]، احمدعلی معاضدی[2]، محمدکاظم غریب ناصری[3]، محمدرضا آخوند[4]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران، اهواز، ایران.

۲- استاد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران، اهواز، ایران.

۳- استاد، گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور، اهواز، ایران.

۴- استادیار، گروه آمار، دانشکده علوم ریاضی و کامپیوتر، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.

یافته / دوره نوزدهم / شماره ۲ / تابستان ۹۶ / مسلسل ۷۲

چکیده

دریافت مقاله: ۹۶/۱/۱۴ پذیرش مقاله: ۹۶/۲/۲۷

مقدمه: اثرات سیستم کولینرژیک از طریق دو نوع گیرنده نیکوتینی و موسکارینی اعمال می‌گردد. با توجه به وجود گیرنده‌های موسکارینی در ایلئوم موش صحرایی، در این مطالعه، اثر کارباکول (آگونیست گیرنده موسکارینی) و اسکوپولامین (آنتاگونیست گیرنده موسکارینی) بر انقباض ایلئوم ناشی از KCl در موش صحرایی نر بالغ مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: بخش انتهایی ایلئوم موش صحرایی نژاد ویستار جدا شد و انقباضات آن تحت یک گرم کشش و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، در حمام بافت حاوی محلول تایرود به روش ایزوتونیک ثبت شد. بافت ایلئوم به‌صورت جداگانه در گروه اول تحت تأثیر KCl سپس کارباکول، گروه دوم تحت تأثیر KCl سپس اسکوپولامین، گروه سوم تحت تأثیر اسکوپولامین به مدت ۳۰ دقیقه سپس KCl، گروه چهارم تحت تأثیر اسکوپولامین با غلظت 10^{-3} مولار به مدت ۳۰ دقیقه سپس کارباکول با غلظت 10^{-2} میلی‌گرم بر میلی‌لیتر قرار گرفت.

یافته‌ها: تفاوت معنی‌داری بین غلظت صفر و غلظت‌های (10^{-2}mg/ml، 10^{-3}، 10^{-4}) کارباکول وجود داشت (P<۰/۰۰۱). تفاوت معنی‌داری بین غلظت صفر و غلظت 10^{-3} M اسکوپولامین (P<۰/۰۱) و نیز مقادیر 10^{-4} M، 10^{-6} وجود داشت (P<۰/۰۰۱). تفاوت معنی‌داری بین غلظت صفر و غلظت 10^{-3} M اسکوپولامین (P<۰/۰۱) و نیز مقادیر 10^{-4} M (P<۰/۰۰۱) و 10^{-6} M (P<۰/۰۵) زمانی که بافت به مدت ۳۰ دقیقه در معرض اسکوپولامین قرار گرفت، وجود داشت.

بحث و نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان داد که غلظت‌های مختلف کارباکول انقباض ناشی از کلرور پتاسیم را به‌صورت وابسته به غلظت تقویت می‌کند و با کلرور پتاسیم اثر سینرژیسم دارد. همچنین غلظت‌های مختلف اسکوپولامین انقباض ناشی از کلرور پتاسیم را به‌صورت وابسته به غلظت کاهش می‌دهد.

واژه‌های کلیدی: انقباض، ایلئوم، کارباکول، اسکوپولامین، موش صحرایی.

*آدرس مکاتبه: اهواز، دانشگاه شهید چمران، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی.

پست الکترونیک: tavalaee1367raede@gmail.com

مقدمه

ایلئوم دارای تعدادی از گیرنده‌ها ازجمله گیرنده‌های موسکارینی، هیستامینی، گابانرژیک، سروتونرژیک و آدرنورسپتورها است (۱). اثرات سیستم کولینرژیک از طریق دو نوع گیرنده نیکوتینی و موسکارینی اعمال می‌گردد (۲). گیرنده‌های موسکارینی دارای ۵ زیر واحد هستند که در سلول‌های عصبی و غیرعصبی وجود دارند و هر کدام به G پروتئین متفاوتی متصل می‌شوند که پاسخ داخل سلولی را مشخص می‌کند. گیرنده‌های M1 و M3 و M5 از طریق فسفولیپاز C و گیرنده‌های M2 و M4 از مسیر آدنیلیل سیکلاز عمل می‌کنند که به وسیله باند شدن استیل کولین به آهستگی تحریک می‌شوند (۳). استیل کولین (ACH) یک انتقال دهنده عصبی تحریکی است که باعث تحریک انقباض عضله صاف و ترشح اپیتلیالی یون می‌شود (۴). در سلول‌های ماهیچه صاف، کانال‌های کلسیمی وابسته به ولتاژ نقش مهمی در غشاهای قابل تحریک دارند (۵). مطالعات نشان می‌دهد که استیل کولین، سلول‌های ماهیچه‌ای صاف ایلئوم در موش صحرایی را تحریک می‌کند که دارای گیرنده M3 موسکارینی هستند و باعث انقباض می‌شود (۶). در ارگان‌های مختلف ازجمله دستگاه گوارش، برونشیول‌های ریه، مثانه و رحم انقباض عضله صاف به واسطه‌ی دو نوع گیرنده M2 و M3 صورت می‌گیرد (۷). همچنین M3 باعث تحریک فعالیت دستگاه گوارش و افزایش ترشح بزاق و غدد اشکی می‌شود (۸). در دستگاه گوارش، در بسیاری از عضلات صاف هر دو زیر گروه M2 و M3 با هم بیان می‌شوند. در اغلب موارد، گیرنده M3 واسطه انقباض است در حالی که سهم گیرنده M2 همچنان نامشخص است (۹). تصور می‌شود که پاسخ انقباضی عضلات صاف به آگونیست‌های موسکارینی در درجه اول، به واسطه‌ی فعال شدن گیرنده‌های موسکارینی M3 صورت می‌گیرد. گیرنده‌های موسکارینی محیطی نقش کلیدی در کنترل ضربان قلب و فعالیت عضلات صاف بازی می‌کنند. فعال‌سازی گیرنده‌های موسکارینی با پاسخ‌های بیولوژیکی مانند ضربان قلب و تولید انقباض در عضله صاف همراه است. با این حال، این توانایی بستگی به نقش فیزیولوژیکی خاص که انواع گیرنده‌های موسکارینی در بافت‌های مختلف دارند، متفاوت است (۱۰). سهم نسبی گیرنده‌های M2 و M3 در شرایط آزمایشگاهی برای عضله دترسور مثانه به ترتیب ۵٪ و ۹۵٪ و برای انقباض عضلات طولی روده ۲۵٪ و ۷۵٪ بوده است (۱۱). آگونیست‌های مختلف باعث القاء انقباض در انواع مختلف سلول‌های عضلات صاف از طریق افزایش همزمان در غلظت کلسیم داخل سلولی می‌شوند. منبع یون کلسیم هجوم کلسیم خارج سلولی و آزاد شدن کلسیم از منابع داخل سلولی است. سهم نسبی منابع داخل سلولی و خارج سلولی بستگی به نوع بافت و حالت تحریک دارد (۱۲). KCl اغلب به عنوان یک ماده برای تحریک گیرنده‌های وابسته به G پروتئین و فعالیت عضله صاف به وسیله تغییر در تعادل پتاسیم و نگه‌داشتن پتانسیل غشا در مقدار بالاتر از سطح استراحت استفاده می‌شود (۱۳). در انقباضات حاصل از KCl، کانال‌های کلسیمی وابسته به ولتاژ دخیل‌اند و وجود نوع L این نوع کانال‌های کلسیمی در عضلات صاف ایلئوم موش صحرایی به اثبات رسیده است (۱۴). انقباض ایلئوم ناشی از KCl، اثر مستقیمی بر عضله صاف ایلئوم دارد. غلظت‌های بالای KCl که به‌صورت خارج سلولی افزوده می‌شود، منجر به دپلاریزاسیون سلولی و در نتیجه فعال‌سازی کانال‌های کلسیمی وابسته به ولتاژ و ورود کلسیم به درون عضله صاف می‌گردد (۱۵).

نشان داده شده که کارباکول به‌صورت وابسته به غلظت (۱μM) دارای اثر انقباضی بر روی حلقه‌های نای است که در این عمل گیرنده‌های M1 دخیل هستند (۱۶). همچنین تحقیقات نشان می‌دهد که کارباکول باعث

فعالیت انقباضی عضلات نای در خوکچه هندی می‌شود (۱۷). داروهای آنتی موسکارینی به طور گسترده‌ای در اختلالات دستگاه گوارش که مربوط به تغییر حرکت هستند، به کار گرفته می‌شود. مشتق چهارتایی اسکوپولامین (هیوسین) زمانی که به‌صورت خوراکی استفاده می‌شود، به‌صورت محلی و بدون تأثیر در عملکرد سایر ارگان‌ها می‌تواند بر روی عملکرد عضله صاف روده اثر بگذارد (۱۸).

هدف از انجام این مطالعه، بررسی اثر کارباکول (آگونیست گیرنده موسکارینی) و اسکوپولامین (آنتاگونیست گیرنده موسکارینی) بر انقباض ایلئوم ناشی از KCl و همچنین بررسی نقش آنتاگونیستی اسکوپولامین بر اثر کارباکول در موش صحرایی نر بالغ است.

مواد و روش‌ها

موش‌های صحرایی نر بالغ از نژاد ویستار با محدوده وزنی ۲۵±۲۲۵ گرم از مرکز تحقیقات، تکثیر و نگهداری حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز تهیه شدند و در شرایط استاندارد دمایی و نوری (۲±۲۴ درجه سانتی‌گراد و دوره ۱۲ ساعته روشنایی و تاریکی) با تهویه مناسب نگهداری شدند و دسترسی آزاد به آب و غذای استاندارد مخصوص جوندگان داشتند. قفس‌هایی که موش‌ها در طول ۲۴ ساعت گرسنگی در آن نگهداری می‌شدند، قفس‌هایی مخصوص با کف توری بوده، بطوری که امکان دسترسی موش‌ها به فضولات خود را جهت استفاده مجدد غیرممکن می‌ساخت.

موش‌ها پس از گذراندن ۲۴ ساعت گرسنگی که دسترسی آزاد به آب داشتند، با اتر به طور خفیف بیهوش سپس نخاعی شده و پس از باز کردن شکم از بخش انتهایی ایلئوم، قطعاتی به طول ۲ سانتیمتر جدا نموده و بلافاصله در پتری که کف آن به وسیله پارافین جامد پوشیده شده و حاوی محلول فیزیولوژیک اکسیژنه سرد بود، قرار داده شد. لازم به ذکر است که محلول فیزیولوژیک سرد قبل از استفاده، اکسیژنه می‌شد. داخل ایلئوم با محلول تایرود اکسیژنه سرد به آرامی شسته شد. سپس، در حمام بافت با حجم ۱۰ میلی‌لیتر و محتوی محلول تایرود (در دمای ۳۷ $^{\circ}C$ و pH=۷/۴) بین دو قلاب استیل زنگ نزن به طور عمودی قرار داده شد و در تمام طول آزمایش جریان مداوم اکسیژن به داخل حمام بافت برقرار بود. تعداد موش‌های مورد استفاده در کل آزمایش ۲۰ عدد بود. چون طول تقریبی ایلئوم ۸ سانتیمتر می‌باشد، لذا از ایلئوم هر موش ۴ قطعه ۲ سانتیمتری جدا شد و برای هر آزمایش ۷ تکرار وجود داشت که از این ۷ تکرار میانگین گرفته شد. علت استفاده از آزمون اندازه‌های تکراری اطمینان از نتیجه به دست آمده از آزمایش بود و عامل زمان هم مؤثر بود چرا که هر نمونه قبل از اضافه شدن KCl یا دارو، در حمام بافت به مدت ۱ ساعت ریکاوری شد و برای مشاهده اثر هر دارو حداقل ۵ دقیقه وقت نیاز بود تا اثر نهایی دارو مشاهده شود. لازم به ذکر است که از هر قطعه ایلئوم تنها برای یک تکرار استفاده شد و برای تکرار بعدی قطعه جدیدی به کار رفت. در گروه اول ۲۸ قطعه ایلئوم و در گروه دوم ۲۱ قطعه، در گروه سوم ۲۱ قطعه و در گروه چهارم ۷ قطعه ایلئوم مورد استفاده قرار گرفت. پروتکل روی بافت ایلئوم در ۴ مرحله انجام شد. در این مطالعه برای کارباکول غلظت‌های 10^{-2}، 10^{-3}، 10^{-4} میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) (۱۹)، برای اسکوپولامین غلظت‌های 10^{-3}، 10^{-4}، 10^{-6} مولار) (۲۰) و برای کلرور پتاسیم غلظت ۶۰ میلی‌مولار (۷) مورد استفاده قرار گرفت. میزان کشش اولیه به بافت ۱ گرم بود. انقباضات ایزوتونیک با استفاده از دستگاه ثبات (ترانسدیوسر ایزوتونیک هاروارد) با سرعت کاغذ ۰/۱ میلی‌متر در ثانیه بر روی یک دستگاه اوسیلوگراف هاروارد ثبت گردید. محلول تایرود حمام دارای ترکیب زیر بر حسب میلی‌مولار بود: NaCl (۱۳۶/۹)، $MgCl_2$ (۱/۰۵)،

KCl (۲/۶۸)، $CaCl_2$ (۱/۸)، NaH_2PO_4 (۰/۴۲)، گلوکز (۵/۵۵) و $NaHCO_3$ (۱۱/۹)که در آب مقطر تهیه شد. کلیه نمک‌ها و گلوکز موجود در محلول تایرود از شرکت مرک آلمان و کارباکول و اسکوپولامین از شرکت سیگمای آمریکا تهیه شده بودند. در این بخش از تحقیق، محلول تایرود حلال کارباکول و آب مقطر حلال اسکوپولامین بود (۲۱).

به منظور بررسی اثر کارباکول بر انقباض ایلئوم ناشی از KCl پس از اطمینان از سلامت بافت طی ثبت پاسخ انقباضی به کلرور پتاسیم و شستشوی ۱۵ دقیقه‌ای متعاقب آن، مجدداً کلرور پتاسیم با غلظت ۶۰ میلی‌مولار به حمام بافت اضافه گردید و پس از آن غلظت‌های مختلفی از کارباکول (10^{-2} mg/ml، 10^{-3}، 10^{-4}) به‌صورت جداگانه به حمام افزوده شد. بطوریکه پس از ثبت اثر یک غلظت از کارباکول و شستشوی ۱۵ دقیقه‌ای بافت، غلظت دیگری از کارباکول به بافت ایلئومی منقبض شده افزوده گردید.

در مرحله دیگر آزمایش، جهت بررسی اثر اسکوپولامین بر انقباض القا شده در ایلئوم توسط کلرور پتاسیم، سه غلظت مختلف از اسکوپولامین (10^{-3} M، 10^{-4}، 10^{-6}) انتخاب شد. پس از اطمینان از سلامت بافت و ایجاد انقباض، هر یک از غلظت‌های اسکوپولامین به طور جداگانه و با فاصله زمانی ۱۵ دقیقه‌ای (جهت شستشوی بافت) به حمام اضافه شدند. در گام دیگر آزمایش، بعد از آماده سازی بافت، کلرور پتاسیم به حمام اضافه شد و پس از اطمینان از سلامت بافت و شستشوی ۱۵ دقیقه‌ای، اسکوپولامین با غلظت‌های مختلف (10^{-3} M، 10^{-4}، 10^{-6}) به‌صورت جداگانه و به مدت ۳۰ دقیقه قبل از تحریک بافت توسط KCl به حمام بافت اضافه گردید.

در مرحله دیگر آزمایش به منظور بررسی نقش آنتاگونیستی اسکوپولامین بر اثر کارباکول، پس از اطمینان از سلامت بافت و شستشوی ۱۵ دقیقه‌ای، اسکوپولامین با غلظت 10^{-3} M و به مدت ۳۰ دقیقه به حمام بافت اضافه گردید. در مرحله بعد کارباکول با غلظت 10^{-2}mg/ml به حمام بافت افزوده شد.

تحلیل آماری

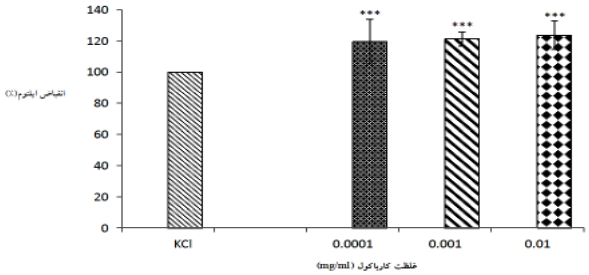
نتایج با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ به طور توصیفی و تحلیلی بررسی شدند. به منظور تحلیل داده‌ها از آنالیز واریانس با اندازه‌گیری تکراری (Repeated Measured) و تست تکمیلی LSD استفاده گردید. نتایج به‌صورت میانگین± انحراف معیار ارائه گردیده است. سطح معنی‌داری برابر با $P<0/05$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

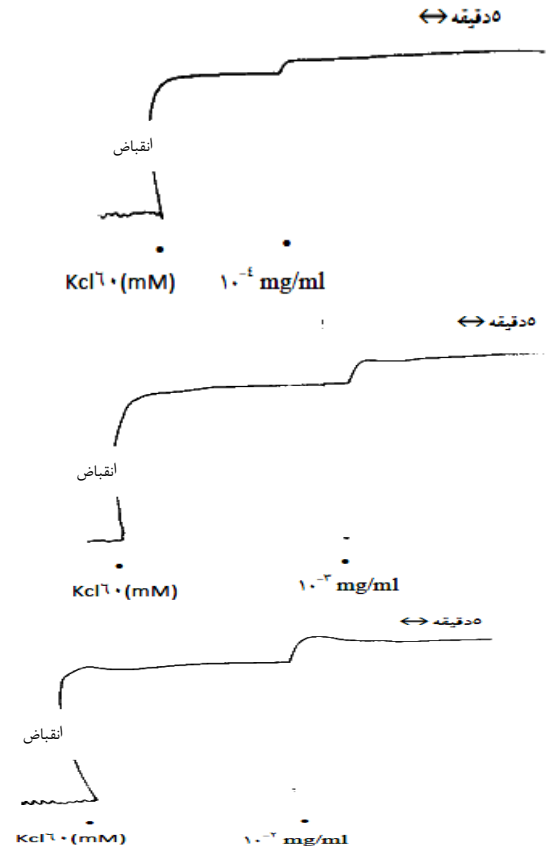
بررسی اثر کارباکول (آگونیست عمومی گیرنده‌های موسکارینی) بر انقباض ایلئوم ناشی از کلرور پتاسیم ۶۰mM:

در این مرحله از آزمایش به دنبال القای انقباض ایلئوم با کلرور پتاسیم ۶۰mM، غلظت‌های مختلفی از کارباکول (10^{-2}mg/ml، 10^{-3}، 10^{-4}) به‌صورت جداگانه به حمام افزوده شد. بطوریکه پس از ثبت اثر یک غلظت از کارباکول و شستشوی ۱۵ دقیقه‌ای بافت، غلظت دیگری از کارباکول به بافت ایلئومی منقبض شده افزوده گردید.

افزودن کارباکول به حمام بافت، انقباض ایجاد شده در بافت ایلئوم را افزایش داد. مقایسه آماری نشان می‌دهد که تفاوت معنی‌داری بین غلظت صفر و غلظت‌های mg/ml 10^{-2}، 10^{-3}، 10^{-4} ($P<0/001$) وجود دارد. انقباضات کلرور پتاسیم توسط غلظت‌های غیر تجمعی کارباکول به‌صورت وابسته به غلظت افزایش یافته است (شکل ۱، شکل ۲).



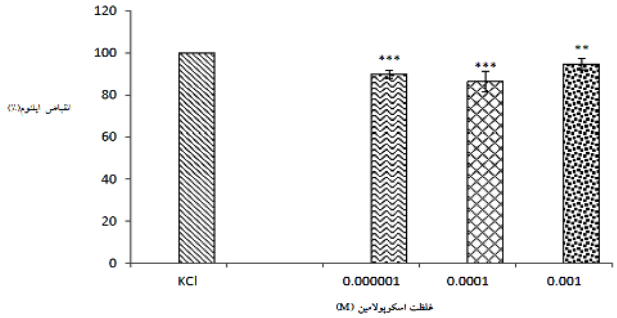
شکل ۱. افزودن غلظت‌های غیر تجمعی کارباکول (10^{-2}mg/ml، 10^{-3}، 10^{-4}) به حمام بافت، انقباض ایجاد شده در بافت ایلئوم (ناشی از کلرور پتاسیم) را به طور معنی‌داری افزایش داد (P<۰/۰۰۱)



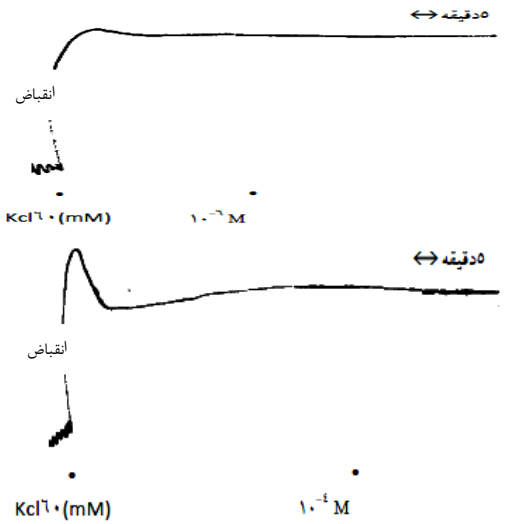
شکل ۲. ثبت حقیقی از تأثیر غلظت‌های مختلف کارباکول بر انقباض ایلئوم ناشی از کلرور پتاسیم (۶۰mM)

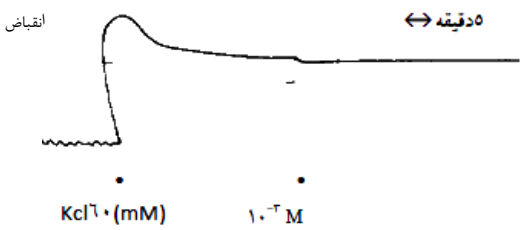
بررسی اثر اسکوپولامین (آنتاگونیست عمومی گیرنده‌های موسکارینی) بر انقباض ایلئوم ناشی از کلرور پتاسیم ۶۰mM:

جهت بررسی اثر آنتاگونیست این گیرنده‌ها بر انقباض القا شده در ایلئوم توسط کلرور پتاسیم، سه غلظت مختلف از اسکوپولامین (10^{-3}M، 10^{-4}، 10^{-6}) انتخاب شد. پس از اطمینان از سلامت بافت و ایجاد انقباض، هر یک از غلظت‌های اسکوپولامین به طور جداگانه و با فاصله زمانی ۱۵ دقیقه‌ای (جهت شستشوی بافت) به حمام اضافه شدند. پاسخ حاصل از افزودن هر یک از غلظت‌های اسکوپولامین یک پاسخ شل کنندگی بود که انقباض ناشی از کلرور پتاسیم را کاهش داد. مقایسه آماری نشان می‌دهد که تفاوت معنی‌داری بین غلظت صفر و 10^{-3} M (P<۰/۰۱) و نیز مقادیر 10^{-4} M، 10^{-6} (P<۰/۰۰۱) وجود دارد (شکل ۳، شکل ۴).



شکل ۳. افزودن غلظت‌های غیر تجمعی اسکوپولامین (M 10^{-3}، 10^{-4}، 10^{-6}) به حمام بافت، انقباض ایجاد شده در بافت ایلئوم (ناشی از کلرور پتاسیم) را به طور معنی‌داری کاهش داد (P<۰/۰۰۱ ،P<۰/۰۱)

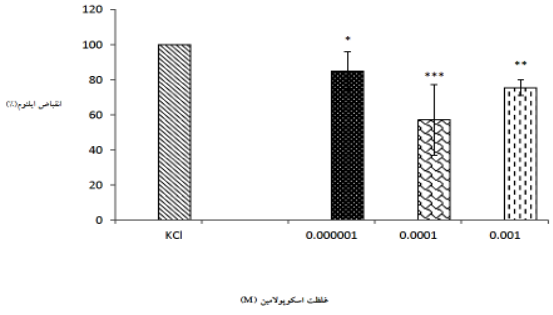




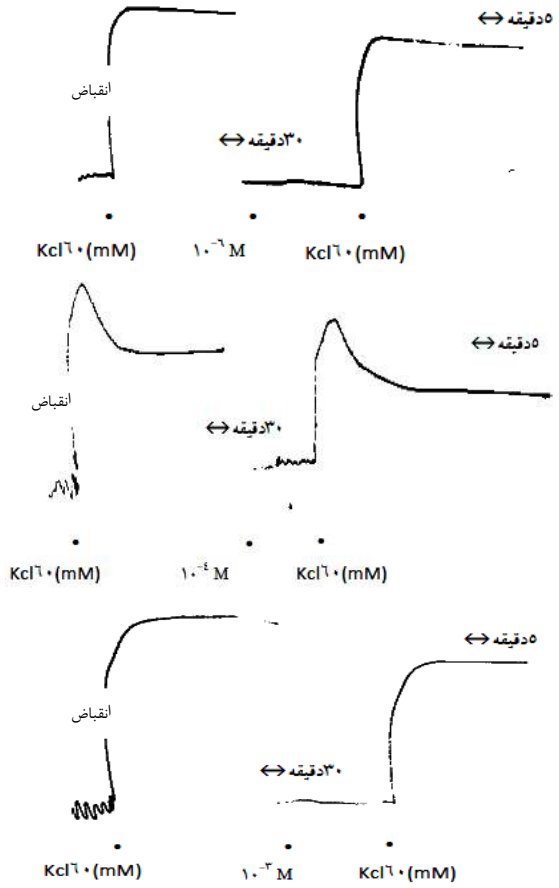
شکل ۴. ثبت حقیقی از تأثیر غلظت‌های مختلف اسکوپولامین بر انقباض ایلئوم ناشی از کلرور پتاسیم (۶۰mM)

بررسی اثر اسکوپولامین (آنتاگونیست عمومی گیرنده‌های موسکارینی) به مدت ۳۰ دقیقه قبل از تحریک بافت توسط کلرور پتاسیم (۶۰mM):

بعد از آماده سازی بافت، کلرور پتاسیم به حمام اضافه شد و پس از اطمینان از سلامت بافت و شستشوی ۱۵ دقیقه‌ای، اسکوپولامین با غلظت‌های مختلف (10^{-3} M، 10^{-4}، 10^{-6}) و به مدت ۳۰ دقیقه قبل از تحریک بافت توسط KCl به حمام بافت اضافه گردید. افزودن اسکوپولامین به مدت ۳۰ دقیقه به حمام بافت اثر کاهشی بیشتری بر انقباض ایجاد شده ایلئوم توسط کلرور پتاسیم داشت. مقایسه آماری t-test نشان می‌دهد که تفاوت معنی‌داری بین غلظت صفر و 10^{-3} M ($P<0/01$) و مقادیر 10^{-4} M ($P<0/001$) و 10^{-6} M ($P<0/05$) وجود دارد (شکل ۵، شکل ۶).



شکل ۵. افزودن غلظت‌های غیر تجمعی اسکوپولامین (10^{-3} M، 10^{-4}، 10^{-6}) به مدت ۳۰ دقیقه به حمام بافت، اثر کاهشی بیشتری بر انقباض ایجاد شده ایلئوم توسط کلرور پتاسیم در مقایسه با افزودن اسکوپولامین بعد از KCl داشت و انقباض را به طور معنی‌داری کاهش داد (P<۰/۰۵، P<۰/۰۱، P<۰/۰۰۱)

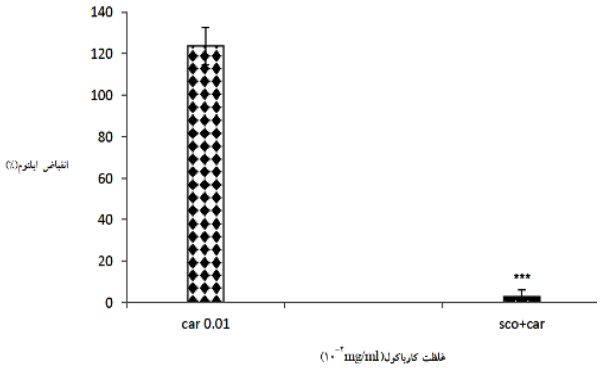


شکل ۶. ثبت حقیقی از تأثیر غلظت‌های مختلف اسکوپولامین بر انقباض ایلئوم ناشی از کلرور پتاسیم (۶۰mM)

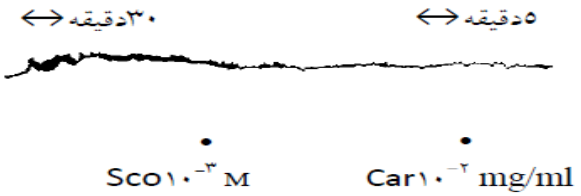
بررسی نقش آنتاگونیستی اسکوپولامین بر اثر کارباکول:

با توجه به اینکه اسکوپولامین به عنوان آنتاگونیست عمومی گیرنده‌های موسکارینی اثر موسکارین و سایر آگونیست‌های گیرنده‌ی مذکور را آنتاگونیزه می‌کند، در این مرحله اثر اسکوپولامین بر کارباکول به عنوان آگونیست عمومی گیرنده‌های موسکارینی مورد بررسی قرار گرفت. بعد از آماده سازی بافت و در یک مرحله جداگانه، کلرور پتاسیم به حمام اضافه شد و پس از اطمینان از سلامت بافت و شستشوی ۱۵ دقیقه‌ای، اسکوپولامین با غلظت 10^{-3} M و به مدت ۳۰ دقیقه به حمام بافت اضافه گردید. در مرحله بعد کارباکول با غلظت 10^{-2}mg/ml به حمام بافت افزوده شد. در این آزمایش اسکوپولامین توانست اثر انقباض دهندگی کارباکول را که

در مراحل قبل به اثبات رسیده بود به طور تقریباً کامل مهار کند (شکل ۷، شکل ۸).



شکل ۷. اسکوپولامین با غلظت 10^{-3} M توانست اثر انقباض دهندگی کارباکول با غلظت 10^{-2}mg/ml را که در مراحل قبل به اثبات رسیده بود به طور تقریباً کامل مهار کند (P<۰/۰۰۱)



شکل ۸. تأثیر انکوباسیون بافت ایلئوم با اسکوپولامین (10^{-3} M، ۳۰ دقیقه) بر عملکرد انقباضی کارباکول (10^{-2}mg/ml) در بافت ایلئوم

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج حاضر از این مطالعه نشان داد که حضور غلظت‌های 10^{-2} mg/ml، 10^{-3}، 10^{-4} کارباکول به‌صورت وابسته به غلظت، انقباض ایلئوم ناشی از کلرور پتاسیم ۶۰mM را افزایش می‌دهد (شکل ۱) و نشان می‌دهد که کارباکول و کلرور پتاسیم یک اثر سینرژیسم داشته‌اند و افزودن کارباکول اثر انقباض دهندگی کلرور پتاسیم را تقویت کرده است. نتایج این مرحله با برخی از گزارشات هم‌خوانی دارد. پراکاش و همکاران در سال ۲۰۰۶، فعالیت شل کنندگی عضلانی اسانس بذر زنجبیل را بر روی عضله صاف دئودنوم بررسی نمودند که پاسخ انقباضی ایجاد شده توسط کارباکول و KCl را شل نمود (۲۲). در مطالعه‌ای که جلیلی نژاد و همکاران در سال ۲۰۱۴، روی عصاره هیدروالکلی ریزوم زنجبیل بر روی انقباض روده موش صحرایی انجام دادند مشخص شد که غلظت‌های غیر تجمعی عصاره زنجبیل (۱۰۰،۲۰۰µg/ml) می‌تواند انقباض ناشی از KCl (۱۲۰µmol/ml) و کارباکول (۱۰۰µmol/ml) را به‌صورت وابسته به دوز کاهش دهد (۲۳). در آزمایشی که گلازا و همکاران در سال ۲۰۱۱ انجام دادند، نشان داده‌اند که کارباکول در غلظت بین 10^{-7} M/L و 10^{-6} باعث انقباض ایزومتریک عضله صاف در روده رت می‌شود که به‌صورت وابسته به غلظت است (۲۴). همچنین ازیبا و همکاران در سال ۲۰۱۱، مطالعات فارماکولوژیک در فعالیت ذاتی سه داروی متاکولین، استیل کولین و کارباکول در آماده سازی ایلئوم جدا شده رت را انجام دادند که در این آزمایش از غلظت‌های (10^{-8} M-10^{-5}) کارباکول به‌صورت تجمعی استفاده شده تا حداکثر پاسخ انقباضی بافت مشاهده شود (۲۵). در ادامه این کار تحقیقی، غلظت‌های مختلفی اسکوپولامین (10^{-3} M، 10^{-4}، 10^{-6}) به عنوان آنتاگونیست عمومی گیرنده موسکارینی به حمام بافت اضافه شد، پاسخ حاصل از افزودن هر یک از غلظت‌های اسکوپولامین یک پاسخ شل کنندگی بود که انقباض ناشی از کلرور پتاسیم ۶۰mM را به‌صورت محسوس کاهش می‌داد (شکل ۳). همچنین در آزمایش جداگانه بافت به مدت ۳۰ دقیقه قبل از تحریک بافت توسط KCl در معرض غلظت‌های مختلف اسکوپولامین قرار داده شد که این بار اثر کاهشی بیشتری بر انقباض ایلئوم توسط کلرور پتاسیم داشت (شکل ۵). در همین رابطه گزارشاتی در خصوص اثر آنتاگونیست‌های سیستم کولینرژیک وجود دارد ازجمله، آتروپین (۱۰۰ میکرومولار) باعث مسدود شدن پاسخ انقباضی استیل کولین (۱۰۰ میکرومولار) در راست‌روده و کولون موش نوزاد و بالغ می‌شود که این انقباضات کولینرژیک به وسیله فعال شدن گیرنده‌های موسکارینی صورت گرفته است. اثر مسدود شدن ناشی از آتروپین در نوزاد انسان نیز گزارش شده است (۲۶). در آزمایشی که

صورت گرفته استیل کولین، بتانکول، کاربـاکول و پیلوکارپین به‌صورت وابسته به غلظت باعث انقباضات تونیک در لایه عضلانی طولی و حلقوی جدا شده معده انسان می‌شوند. آتروپین، تری هگزی فنیدیل، پیرنزپین، تلنزپین و اسکوپولامین موجب مسدود شدن انقباضات تونیک ناشی از استیل کولین در هر دو لایه عضلانی طولی و حلقوی می‌شوند و نتایج پیشنهاد می‌کنند که M1، گیرنده موسکارینی غالب در عضله صاف معده انسان است (۲۷). عصاره آبی برگ Solanum aethiopicum به‌صورت وابسته به دوز باعث انقباضات ایلئوم در خوکچه هندی می‌شود و آتروپین (آنتاگونیست کولینرژیک) می‌تواند به‌صورت وابسته به غلظت این پاسخ را مهار کند (۲۸). اسکوپولامین به عنوان ضد درد استفاده می‌شود و عامل شل کننده عضله صاف و ضد اسپاسم می‌باشد (۲۹). با توجه به اینکه اسکوپولامین به عنوان آنتاگونیست عمومی گیرنده‌های موسکارینی اثر استیل کولین و سایر آگونیست‌های گیرنده مذکور را آنتاگونیزه می‌کند، در مرحله جداگانه اثر اسکوپولامین بر کارباکول به عنوان آگونیست عمومی گیرنده موسکارینی مورد بررسی قرار گرفت که خنثی کردن تقریباً کامل اثر کارباکول به وسیله اسکوپولامین ملاحظه شد (شکل ۷).

در آخر می‌توان نتیجه گرفت اثر کارباکول بر انقباض ناشی از KCl یک اثر تقویت کننده انقباض می‌باشد، در واقع می‌توان گفت کارباکول با کلرور پتاسیم اثر سینرژیسم دارد. اثر اسکوپولامین بر انقباض ناشی از KCl یک پاسخ شل کنندگی می‌باشد. ضمناً دامنه‌ی انقباضات ایجاد شده توسط کارباکول و نیز شل شدگی حاصل از اسکوپولامین بسیار گسترده‌تر از غلظت‌های ذکر شده در این مطالعه می‌باشد، اما به دلیل محدودیت زمانی از ذکر آنها در این مقاله خودداری شده است.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله محققان از معاونت پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز به منظور تأمین هزینه‌های این کار پژوهشی کمال تشکر و قدردانی را به عمل می‌آورند.

References

1. Bhutada PS, Mundhada Y, Jain KS, Nandakumar K. Isolated goat ileum preparations an alternative to isolated ileum preparation from laboratory animals. Indian J Pharmacol. 2006; 38: 140-141.
2. Bemani-Lirgeshasi S, Khajehpour L, Moazedi AA. [The Interaction of Cholinergic Muscarinic and Beta-1 Adrenergic Receptors of the CA1 Region in Passive Avoidance Memory Formation in Rat]. J Babol Univ Med Sci. 2014; 16(1): 22-30.
3. Harrington AM, Peck CJ, Burcher LL, Hutson JM, Southwell BR . Localization of muscarinic receptors M1R, M2R and M3R in the human colon .Neurogastroenterology & Motility. 2010; 22: 259-263.
4. Eliades L, Erlandson M, Ruiz A. Effects of Hibernation on the Enteric Nervous System of the Thirteen-lined Ground Squirrels. J Undergraduate Res. 2014; 1-6.
5. Unno T, Komori S, Ohashi H. Inhibitory effect of muscarinic receptor activation on Ca^{2+} channel current in smooth muscle cells of guinea-pig ileum. J Physiology. 1995; 484(3): 567-581.
6. Barocelli E, Chiavarini M, Ballabeni V, Bordi F, Impicciatore IM . Interaction of selective compounds with muscarinic receptors at dispersed intestinal smooth muscle cells. British J Pharmacology. 1993; 108: 393-397.
7. Shah N, Khurana S, Cheng K, Raufman JP. Muscarinic receptors and ligands in cancer. Am J Cell Physiology. 2009; 296: 221-232.
8. Ragozzino ME, Artis S, Singh A, Twose TM, Beck JE, Messer WS. The Selective M1 Muscarinic Cholinergic Agonist CDD-0102A Enhances Working Memory and Cognitive Flexibility. J Pharmacology Experim Ther. 2012; 340: 588-594.
9. Harold GP, Pawel SK, Tom C, Vaishnav R, Lisanne GL. Pharmacological and Molecular Characterization of Muscarinic Receptor Subtypes in Human Esophageal Smooth Muscle. Parmacology Experim Ther. 2000; 879-888.
10. Stengel PW, Gomeza J, Wess J, Cohen ML. M2 and M4 Receptor Knockout Mice: Muscarinic Receptor Function in Cardiac and Smooth Muscle In Vitro. J Pharmacology Experim Ther. 2000; 292: 877-885.
11. Matsui M, Motomura D, Fujikawa T, Jiang J, Takahashi S, Manabe T, et al. Mice Lacking M2 and M3 Muscarinic Acetylcholine Receptors Are Devoid of Cholinergic Smooth Muscle Contractions But Still Viable. J Neuroscience. 2002; 22(24): 10627-10632.
12. Zhou H, Kong DH, Pan QW, Wang HH. Sources of calcium in agonist-induced contraction of rat distal colon smooth muscle in vitro. World J Gastroenterology. 2008; 14(7): 1077-1083.
13. Ratz PH, Berg KM, Urban NH, Miner AS. Regulation of smooth muscle calcium sensitivity: KCl as a calcium sensitivity stimulus. Am J Cell Physiology. 2005; 769-783.

14. Gharib Naseri MK, Gharib Naseri Z, Mohammadian M, Birgani MO. [Ileal relaxation induced by Mentha longifolia (L.) leaf extract in rat]. Pakistan J Biol Sci. 2008; 11: 1594-1599.
15. Sadraei H, Ghannadi A, Malekshahi K. [Relaxant effect of essential oil of Melissa officinalis and citral on rat ileum contraction]. Fitotarapia. 2003; 74: 445-452.
16. Sanchez A, Navarrete G, Millan C, Aguilar B, Ortiz R, Estrada S. Relaxant effect of 7-ethoxy-4-methyl-2H-chromen-2-one by calcium channel blockade: computational and ex vivo studies. J Applied Pharmaceutical Sci. 2014; 4(1): 46-51.
17. Walland A, Hammer R. Muscarinic contraction in isolated guinea-pig trachea and antagonism by noradrenaline. European Respiratory J. 1997; 10: 1814-1819.
18. Conti L, Giacomtti S, Scherini E, Ladinsky H. Idintification of Orally Administered Cimetropium Bromide in the Colon of the Rat and its Possible Local Spasmolytic Effect. Pharmacological. 1989; 21: 125-126.
19. Morales MA, Ahumada F, Castillo E, Burgos R, Christen Ph, Bustos V. Inhibition of Cholinergic Contractions of Rat Ileum by Tropane-Type Alkaloids Present in Schizanthus hookeri. Verlag der Zeitschrift fur Naturforschung, Tubingen. 2013; 68: 203-209.
20. Phillips JK, Hickey H, Hill CE. Heterogeneity in mechanisms underlying vasodilatory responses in small arteries of the rat hepatic mesentery. Autonomic Neuroscience: Basic Clin. 2000; 83: 159-170.
21. Gharib Naseri MK, Navid Hamidia M, Heidari A. [Vasorelaxatory Effect of Vitis vinifera Extract on Rat Aorta]. Iranian J Pharmaceutical Res. 2005; 93-99.
22. Prakash O, Kasana.V, Pant A, Zafar A, Hore SK, Mathela CS. Phytochemical composition of essential oil from seeds of Zingiber roseum Rosc. and its antispasmodic activity in rat duodenum. J Ethnopharmacology. 2006; 106: 344-347.
23. Jalali-Nezhad AA, Farajian-Mashhadi F, Komeili Gh, Barkhordari-Ahmadi F. [The Effect of Ginger Hydroalcholic Extract on Rat Ileal Contraction in Vitro]. Zahedan J Res Med Sci. 2014; 29-33.
24. Glaza I, Szadujkis-Szadurski L, Szadujkis-Szadurski R, Gajdus M, Olkowska J. Modulating activity of M1 receptor to the reaction of ileal smooth muscle. Postepy Hig Med Dosw. 2011; 65: 478-481.
25. Aziba P, Sokan JO, Ifedayo O, Kasim LS. The pharmacological studies on intrinsic activities of acetylcholine, methacholine, and carbachol (Homologous Drugs) on isolated rat ileum preparation. J Med Sci. 2011; 2(8): 1047-1049.
26. Singh S, Mandal MB. In Vitro Study Acetylcholine and Histamine Induced Contractions In Colon and Rectum of Adult and Neonate Rats. Indian J Physiology Pharmacology. 2013; 57(2): 104-113.
27. Jankovic SM, Beleslin DB. Muscarinic Receptor Subtype in Smooth Muscle From The Body of Humane Stomach. Med J Islamic Republic of Iran. 1996; 137-143.

28. Saba AB, Dina OA, Adedapo AA, Akhiromed IO. Effect of Aqueous Leaf Extract of Solanum Aethiopicum on Isolated Guinea Pigileum. African J Biomed Res. 2003; 6: 146-147.

29. Boros B, Farkas A, Jakabova S, Bacskay I, Kilar F, Felinger A. LC-MS Quantitative Determination of Atropine and Scopolamine in the Floral Nectar of Datura Species. Springer Fach Wiesbad GmbH. 2010; 1-7.

The role of muscarinic receptors in contractions of adult male Rat's isolated ileum

***Tavalaee R*[1*], *Moazedi AA*[2], *Gharibnaseri MK*[3], *Akhond MR*[4]**

1.MSc student, Department of Biology, Faculty of Science, Ahvaz Shahid Chamran University, Iran. tavalaee1367raede@gmail.com

2. Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Ahvaz Shahid Chamran University, Iran.

3. Professor, Department of Physiology, Faculty of Medicine, Ahvaz Jondishapour University of Medical Sciences, Iran.

4. Assistant Professor, Department of Statistics, Faculty of Mathematics and Computer Science, Ahvaz Shahid Chamran University, Iran.

Received: *3 April 2017* **Accepted:** *17 May 2017*

Abstract

Background: The effects of cholinergic system are applied through both nicotine and muscarinic receptors. Considering to muscarinic receptorsexistence in therat ileum, in this researchthe effectof carbachol (muscarinic receptor agonist) and scopolamine (muscarinic receptor antagonists) on the ileum contraction induced by KCl in adult male rats were studied.

Materials and Methods: The distal part of Wistar rat's ileum was separated and its contractions were recorded under one gr stretching and 37 degree temperature in the bathroom containing the solution of Tyrode by Isotonic method. The ileum tissue separately affected by KCl then carbachol in the first group, KCl then scopolamine in the second group, scopolamine for 30 minutes then KCl in the third group and 10^{-3} M concentration of scopolamine for 30 minutesthen 10^{-2} M concentration carbachol in the fourth group.

Results: There was a significant difference between zero concentration and (10^{-2},10^{-3},10^{-4}mg/ml) concentrations of carbachol ($P<0.001$). There was a significant difference between zero concentration and 10^{-3} M concentration of scopolamine ($P<0.01$) and also the values of 10^{-4}, 10^{-6}M ($P<0.001$). There was a significant difference between zero concentration and 10^{-3} M concentration of scopolamine ($P<0.01$) and also the values of 10^{-4}M ($P<0.001$) and 10^{-6}M ($P<0.05$) when scopolamine was exposed tissue for 30 minutes.

Conclusion: This study showed that different concentrations of carbachol enhance induced contraction by potassium chloride in a concentration-dependent manner and has a synergistic effect with potassium chloride. Also, different concentrations of scopolamine decrease induced contraction by potassium chloride in a concentration-dependent manner.

Keywords: Contraction, Ileum, Carbachol, Scopolamine, Rat

Citation: Tavalaee R, Moazedi AA, Gharibnaseri MK, Akhond MR. The role of muscarinic receptors in contractions of adult male Rat's isolated ileum. Yafte. 2017; 19(2): 103-114.